

标记抗人肺癌单抗超顺磁性氧化铁粒子的磁共振免疫显像实验

许乙凯 颜江华 张嘉宁 刘杏元 黄其鏊

摘要 目的: 探讨标记抗人肺癌单抗的超顺磁性氧化铁微粒(SPIO)进行磁共振免疫显像的可能性。材料与方法: 将采用 Fe(III) 与 Fe(II) 混合液在碱性条件下制备 SPIO 微粒; 将粒径 $4.5\text{nm} \pm 3.4\text{nm}$ 的 SPIO 微粒标记到抗人肺癌单抗(McAbs)上; 观察静注 SPIO—McAbs 定向改变载瘤裸鼠($n=4$)MR 信号强度的可能性。结果: SPIO—McAbs MR 成像能有效地降低全部瘤靶的 MR 信号。结论: 磁共振免疫成像是一种有发展前景的肿瘤靶向显像新途径。

关键词 磁共振成像 造影剂 单克隆抗体

The Experimental Study of Magnetic Resonance Immunoimaging Using Anti-human Lung Cancer Monoclonal Antibodies Coated Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticle Xu Yikai, Yan Jianghua, Zhang Jianing, et al. Medical Imaging Center, Nanfang Hospital, the First Military Medical University, Guangzhou 510515

ABSTRACT Objective: To investigate the possibility of MR immunoimaging using monoclonal antibodies against human lung cancer (McAbs) labelled with superparamagnetic iron oxide nanoparticle (SPIO). **Materials and Methods:** SPIO with a mean diameter of $4.5\text{nm} \pm 3.4\text{nm}$, was synthesized by reaction of Fe(III) and Fe(II) with dextran under the alkaline condition. The McAbs coupled covalently to SPIO was achieved with the potassium periodate method. Then the McAbs—SPIO was injected intravenously in nude mice hosted human lung cancer ($n=4$). **Results:** The MR contrast agent of SPIO—McAbs can selectively reduce the signal intensities of the tumor targets. **Conclusion:** The data indicate MR immunoimaging may become a new approach for specific imaging of tumors.

Key words Magnetic resonance imaging Contrast agent Monoclonal antibody

本文将我院标记抗人肺癌单抗的超顺磁性氧化铁微粒(SPIO)对载瘤裸鼠 MR 免疫显像的实验结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 SPIO 的制备和人肺腺癌单抗来源

SPIO 制备采用浓度 50%氯化铁、氯化亚铁和适量右旋糖酐(WM 10000)在 NaOH 作用下而生成。用 13000 转/分离心 30 分钟除去过大粒子, 上清液用 10mM HEPES 缓冲液透析除去未反应铁离子及游离右旋糖酐, 经超滤器(美国 Millipore)浓缩至 9mg Fe/ml 备用, 铁含量采用邻二氮菲分光光度法^[1]进行测定。JEM-1200 透射电镜测电子致密 SPIO 核心粒径大小为平均 $4.5\text{nm} \pm 3.4\text{nm}$ (图 1)。

抗人肺腺癌单抗(3D₃)用厦门大学抗癌研究中心制备提供。该抗体属 IgG₁, 所识别的抗原决定簇为肺腺癌细胞膜的糖蛋白, 亲和常数为 $2 \times 10^{-8} \text{mol/L}$ 。3D₃ 用正辛酸-硫酸铵法沉淀纯化, 再 DEAE-52 离子交换层析后备用。用 756mc 分光光度计按 $E_{280} 1\% = 14$ 计算 IgG 含量。

1.2 McAbs—SPIO 的标记

本研究为国家自然科学基金资助项目(编号 39470223)

作者单位: 510515 广州, 第一军医大学南方医院影像中心(许乙凯、刘杏元、黄其鏊); 第一军医大学实验动物研究所(张嘉宁); 361005 厦门大学抗癌研究中心(颜江华)

参考 Dutton 方法进行^[2]: 取含铁量为 20mg 的 SPIO 液, 加入 500mg NaIO₄, 室温下避光氧化 60 分钟, 再与 1000ml 20mM 硼酸钠(pH 8.5)透析 40 小时, 形成氧化 SPIO 液。取 0.5ml 氧化 SPIO 液(含铁量 2mg), 与内含 1.5mg 3D₃ 单抗的 0.5ml 20mM NaIO₄ 缓冲液混合, 室温下作用 4 小时, 再用 50% 0.25M NaBH₄ 4℃还原 30 分钟, 此时 SPIO 右旋糖酐衣上的糖基转变为醛基团, 与单抗分子的氨基团产生共价结合。超速离心 3 万转/分 30 分钟, 分离 McAbs—SPIO 与游离 3D₃, 冻干后长期保存或在 4℃下 24 小时内使用。

1.3 结合实验

取一小块新鲜肺腺癌组织, 制成细胞混悬液(用德国 Boehringer Mannheim 公司生产的 RPM 1654 细胞培养液稀释), 细胞数约为 1×10^7 个/ml。取 3 支试管, 分别加入肺腺癌混悬液 1ml。第 1、2 管分别加入含铁量为 10^μg 的 McAbs—SPIO 和未标记 SPIO(阴性对照), 4℃孵育 2 小时, 离心(400×g, 5 分钟)RPM 1654 液洗 3 次, 除去未结合 SPIO 粒子; 第 3 号试管直接加入 10^μg Fe 的 SPIO, 用 RPM 1654 液稀释至 2ml 作为阳性对照管; 用我院 0.28Tesla MRI 仪测各管 T₂ 值(TR=2000ms/TE=34, 68…272ms, 共 8 个回波)。

1.4 载瘤裸鼠的 MRI 免疫成像试验

裸鼠(6 只)由第一军医大学实验动物研究所提供, 饲养在 SPF 室, 体重 18~20g(4~6 周鼠龄), 皮下注入肺腺癌细胞 3×10^7 /只, 待瘤生长至 0.5~0.6cm

左右供实验用。为了有效抑制网状内皮系统对 SPIO—McAbs 的吞噬和廓清作用,使 SPIO—McAbs 尽可能多地到达瘤靶区,每只载瘤裸鼠预先 6h 从尾静脉注入 10mg Fe 的大粒子 SPIO 注射液(暂定名为超磁显注射液,由本中心研制,平均粒径 20nm),使裸鼠体内网状内皮系统饱和性吞噬了大量的大粒子 SPIO(图 2)。4%水合氯醛[Cl₃CCH(OH)₂] 0.01ml/g 腹腔注射麻醉后,用我院 MRI 仪及膝关节小线圈获(TR/TE1000/34ms)T₂ 加权平扫像,随后按含铁量 1.2mg 的 SPIO—McAbs/20g 体重从尾静脉注入 SPIO—McAbs。6 只裸鼠中,因尾静脉细小而导致注射失败 2 只,仅 4 只注射成功,于注药后 12 小时获增强像。

2 结果
2.1 SPIO—McAbs 免疫活性(附表)

附表 肺腺癌细胞结合试验

管号	处 理	T ₂ (ms)
1	SPIO—McAbs	94
2	SPIO(阴性对照)	283
3	阳性对照	47

从附表可见:SPIO—McAbs 管的 T₂ 值为 94ms,较 SPIO 管(阴性对照)有明显的 T₂ 缩短,说明 SPIO—McAbs 中单抗的免疫活性仍有较高水平,且与肺腺癌细胞有特异性结合。
2.2 载瘤裸鼠的增强试验
4 只裸鼠瘤灶在平扫 T₂ 加权像上均显略高信号,注射 SPIO—McAbs 后,瘤体信号强度均有轻、中度下降(图 2~4)。



图 1 透射电镜放大 4 万倍 SPIO 粒子像 图 2 预先 6 小时静注大粒子 SPIO 后,小鼠肝脏信号显著降低 图 3 载瘤鼠 T₂ 加权像,皮下瘤结(×)呈不均匀略高信号 图 4 注射 SPIO—McAbs 后 12 小时,皮下瘤结信号中等降低

3 讨论
众所周知,肿瘤放射免疫显像(radioimmunomaging, RII)已有近 30 年发展史,其原理是以抗肿瘤单克隆抗体(McAbs)或其片段为特异性导向载体,将放射性核素靶向浓聚在肿瘤局部,然后用 SPECT 对肿瘤进行显像的独特诊断技术。目前国内外已有将¹³³I ^{99m}Tc 等核素标记的抗人肺癌单抗用于动物或临床病人的 RII 报道^[3,4],取得了良好的显像效果。从理论上讲,RII 不但可能解决肺肿块良恶性鉴别这一棘手且常见的临床难题,而且通过选择针对不同组织类型肺癌单抗,有可能进一步确定肺癌的组织类型。不过,由于 RII 存在着分辨率差、不能全面地显示瘤灶确切位置及详细的邻近解

剖关系等缺陷,因而制约了 RII 在临床上的普遍应用。借助 RII 的基本原理及磁共振成像具有很高软组织分辨率的优势,将顺磁性标记的单克隆抗体或单抗片段用于肿瘤的磁共振免疫显像,将有望弥补 RII 的不足,同时保留 RII 特异性较强的优点。
早期用于单抗顺磁性标记的元素是 Gd(III),其外周有 7 个不成对电子,顺磁性效应最强。借助双向络合剂 DTPA 环酞作桥梁,Gd³⁺ 能与单抗分子偶合,形成 Gd-DTPA-McAb 复合物。一般认为,游离 Gd³⁺ 有效造影浓度为 50~100^μm/kg;与 McAb 结合的 Gd³⁺,受生物大分子(McAb 分子)转动缓慢的影响(相关作用时间(correlating time)较长),顺磁性效应可提高 6 倍;加上每个单抗分子可携带 3~4 个 Gd³⁺,因此,要实现肉眼可

分辨的靶区信号强度变化,理论上局部单抗浓度,必须达到 $1.5\mu\text{mol/kg}$ 以上,而实际上,通过静注方式进入体内的 McAbs,到达瘤体局部单抗水平仅为 nmol/kg 水平,因此尽管 Gd-DTPA-McAb 可以改变瘤灶 $15 \sim 30\text{msec}$ 的 T_1 值,但未达满意的造影效果^[3]。1992 年,Weissleder 首先应用单晶氧化铁微粒(MION)标记抗肌凝蛋白单克隆抗体片段,成功地实现了大鼠心肌梗塞模型的 MR 免疫显像^[4]。所用 MION 实际上属于一种 SPIO 的一种亚型,特点是粒径小,穿透力强,且弛豫率约为同样条件下 Gd^{3+} 的 $7 \sim 10$ 倍,是目前较理想的磁共振示踪剂。如果采用多种不同组织类型肺癌单抗组合标记(Cocktails),并选用 SPIO 更加敏感的 GRE 序列及图像后处理技术,可望获更佳显像效果。本文通过预先封闭网状内皮系统的方法,使注入体内 SPIO—McAbs 复合物逃避了吞噬细胞清除,结果达到瘤靶的 SPIO—McAbs 浓度明显提高,从而成功地实现了瘤灶选择性信号改变。进一步表明:SPIO—McAbs MR 免疫成像是—

种有发展前景的肿瘤定性诊断新方法。

参考文献

- 1 谢国梅 周小红 班景昭,等主编.分析化学试验.浙江大学出版社,1988,88
- 2 Dutton AH, Tokuyasu KT, Siner SJ. Iron-dextran antibody conjugates: Several method for simultaneous staining of two components in high resolution immunoelectron microscopy. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 76:3392
- 3 Dazord L. Immunoscintigraphic detection of lung squamous cell carcinoma with an ^{131}I labelled monoclonal antibody (po66) Nucl Med Biol 1989, 16: 179
- 4 孙晓春,周前.几种抗人肺癌细胞单克隆抗体及其片段放射免疫显像的实验研究.中华核医学杂志,1997,17(1):46
- 5 Anderson-Berg WT, Strand M, Lempert TE, et al. Nuclear magnetic resonance and gamma camera tumor imaging using gadolinium labeled monoclonal antibodies. J Nucl Med, 1986, 27: 829
- 6 Weissleder R, Lee AS, Khaw BA, et al. Antimyosin-labeled monocrystalline iron oxide allows detection of myocardial infarct: MR antibody imaging. Radiology, 1992, 182:381

(收稿:1998-02-11 修回:1998-07-20)

纵隔脂肪瘤并右肺中叶阻塞炎症一例

孙殿敬 庄悦新 张良明 左秀兰

患者 男,40岁。右上胸痛伴发热1天,呼吸时胸痛加重,咳嗽白痰,无血丝。查体无阳性体征发现。X线片示右肺门见一直径约4cm圆形肿块影,密度均匀,边缘光滑锐利,病变内缘隐约可见。右心缘显示不清,邻近肺内有片状阴影,边缘模糊。X线诊断:右肺中心型肺癌伴右肺中叶阻塞性炎症(图1)。术前为

明确肺门、纵隔淋巴结有无肿大行CT检查。CT示右中纵隔心缘旁见一约 $3.5\text{cm} \times 5.8\text{cm}$ 大小脂肪密度肿块影,CT值为-104HU,密度均匀,边缘清楚。肿块压迫右肺中叶内侧支气管致右肺中叶内侧段阻塞性炎症。CT诊断:右纵隔脂肪瘤并右肺中叶内侧段阻塞性炎症(图2、3)。

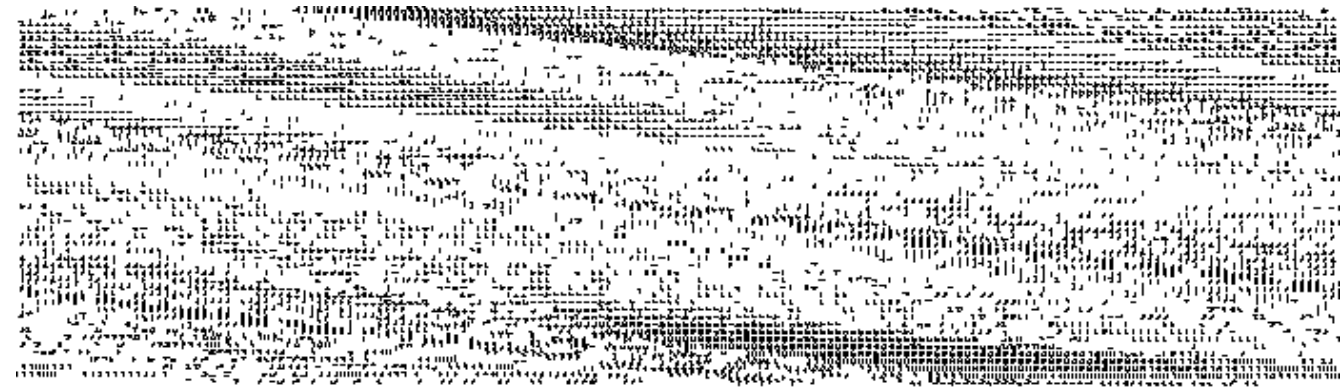


图1 右肺门见一直径约4cm肿块,边缘光滑,内缘隐约可见,右肺中叶有片状阴影 图2 右中纵隔见脂肪密度肿块,CT值-104HU,压迫右肺中叶内侧段支气管 图3 肿块压迫右肺中叶内侧段支气管,并右肺中叶内侧段阻塞炎症

手术所见:右纵隔心缘旁脂肪性肿块,大小约 $4\text{cm} \times 5.5\text{cm} \times 6\text{cm}$,有完整包膜。术后病理诊断:脂肪瘤。

讨论 纵隔脂肪瘤为纵隔内较少见肿瘤,CT表现典型,诊断不难。但X线平片诊断有一定难度。特别是本例患者,X线平片显示病灶主要位于肺内,且隐约可见其内缘,并伴有右肺中

叶炎症的存在,所以误诊为右肺中心型肺癌并右肺中叶阻塞性炎症。后经CT检查明确诊断,充分显示了CT检查的优越性。

(收稿:1997-06-16)

作者单位:256603 山东滨州医学院附院CT室